KSÜ Tarım ve Doğa Derg 25(5): 974-985, 2022
KSU J. Agric Nat 25(5): 974-985, 2022
https://doi.org/10.18016/ksutarimdoga.vi.959044

Clinopodium serpyllifolium subsp. *serpyllifolium* Bitkisinin Akciğer Kanseri ve Beyin Glioma Hücre Hatlarında Antikanser, Antiproliferatif ve Apoptotik Hücre Ölümü Üzerine Etkilerinin Araştırılması

Sevgi GEZICI[1,2], Didem KOCUM[1,2], Fatih YAYLA[3], Nazim SEKEROGLU[3]
[1]Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Gaziantep, [2]İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (İTAMER), Genetik Araştırma Laboratuvarı, Kilis-Türkiye, [3] Gaziantep Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Gaziantep-Türkiye
[1]https://orcid.org/0000-0002-4856-0221, [2]https://orcid.org/0000-0003-2519-0608, [3]https://orcid.org/0000-0002-6490-6288
[4]https://orcid.org/0000-0002-0630-0106
✉: drsevgigezici@gmail.com

ÖZET

Bu çalışmada, Türkiye florasında doğal olarak yetişen ve zengin fitokimyasal içeriği sayesinde geleneksel halk tıbbında yaygın olarak kullanılan *Clinopodium serpyllifolium* subsp. *serpyllifolium* bitkisinin sitotoksik, antiproliferatif ve apoptotik aktivitelerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, bitkinin çiçek ve gövde kısımlarından su (dH_2O) ve %70'lik etanol (C_2H_5OH-EtOH) çözücüleri kullanılarak ekstraktlar elde edilmiştir. Farklı ekstraktların antikanser, antiproliferizasyon ve DNA hasarı gelişimi üzerine apoptotik aktiviteleri; A549, H1299, C6 ve HUVEC hücrelerine karşı sırasıyla MTT, tripan mavisi ve immünolojik temelli ELISA yöntemleri kullanılarak analiz edilmiştir. Bitki ekstrelerinin, çalışılan kanser hücre hatlarının her üçünde de hücrelerdeki canlılık oranlarını azaltarak, hücreleri ölüme teşvik ettiği saptanmıştır. Ekstreler, en yüksek aktiviteyi A549 akciğer karsinoma hücrelerine karşı; en düşük aktiviteyi ise C6 beyin glioma hücreleri üzerine göstermiştir. Sonuç olarak, *C. serpyllifolium* bitkisinin çiçek ve gövde kısımlarının fitokimyasal içeriğinin belirlenmesi ve bitkinin antikanser drog olarak kullanımına yönelik farmakolojik ve klinik çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Moleküler Biyoloji ve Genetik

Araştırma Makalesi

Makale Tarihçesi
Geliş Tarihi : 29.06.2021
Kabul Tarihi : 02.09.2021

Anahtar Kelimeler
Clinopodium spp.
Kanser
Apoptoz
Proliferizasyon
Tıbbi Bitki

Investigation of Anticancer, Antiproliferative and Apoptotic Cell Death Effects of *Clinopodium serpyllifolium* subsp. *serpyllifolium* in Lung and Brain Glioma Cell Lines

ABSTRACT

In this study, it was aimed to investigate cytotoxic, antiproliferative and apoptotic activities of *Clinopodium serpyllifolium subsp. serpyllifolium*, which grows naturally in the flora of Turkey and has been widely used in traditional folk medicine thanks to its rich phytochemical content. For this purpose, water (dH_2O) ve 70% ethanol (C_2H_5OH-EtOH) extracts were obtained from flower and stems of the plants using different solvents. The activities of different extracts on the anticancer, antiproliferation and DNA damage-based apoptosis activities against A549, H1299, C6 and HUVEC cells using MTT, trypan blue and immunological-based ELISA methods, respectively. It was determined that plant extracts decreased viability of all the cells and induced these cells to die. The extracts showed the highest activity against the A549 lung carcinoma cells, whilst they showed the lowest activity against the C6 brain glioma cells. In conclusion, it is considered that different parts of the *C. serpyllifolium* should be phytochemically investigated in details, pharmacological and clinical studies ought to be carried out in order to use this plant as anticancer drug source.

Molecular Biology and Genetics

Research Article

Article History
Received : 29.06.2021
Accepted : 02.09.2021

Keywords
Clinopodium spp.
Cancer
Apoptosis
Proliferation
Medicinal Plant

To Cite : Gezici S, Kocum D, Yayla F, Sekeroglu N 2022. Manuscript Title. Investigation of Anticancer, Antiproliferative and Apoptotic Cell Death Effects of *Clinopodium serpyllifolium subsp. Serpyllifolium in Lung and Brain Glioma Cell Lines.* KSU J. Agric Nat 25(5): 974-985. https://doi.org/10.18016/ksutarimdoga.vi.959044

Atıf İçin: Gezici S, Kocum D, Yayla F, Sekeroglu N 2022. *Clinopodium serpyllifolium* subsp. *serpyllifolium* Bitkisinin Akciğer ve Beyin Glioma Hücre Hatlarında Antikanser, Antiproliferatif ve Apoptotik Hücre Ölümü Üzerine Etkilerinin Araştırılması. KSÜ Tarım ve Doğa Derg 25(5): 974-985. https://doi.org/10.18016/ksutarimdoga.vi.959044

GİRİŞ

Antik çağlardan bu yana bitkiler tedavi amacıyla kullanılmakta ve her geçen gün bitkilerin tıp ve eczacılık alanlarında kullanım potansiyellerinde ciddi bir artış gözlenmektedir. Tıbbi bitkilerin biyoçeşitliliği, yeni şifalı bitkilerin tespit edilmesiyle sayı olarak gün geçtikçe ciddi bir artış göstermektedir. Dünya Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) tarafından dünya genelinde 422 bin kadar çiçekli bitki taksonundan yaklaşık %17'sinin (yaklaşık 72 bin) tıbbi değer taşıdığı ve bunlardan yaklaşık 5 bin kadarının dünya ticaretinde yer aldığı bildirilmiştir (Baytop, 1999; Baydar, 2020). Tıbbi bitkilerin ulaşımlarının ve kullanımlarının kolay, maliyetinin az, yan etkilerinin sentetik ilaçlara göre daha düşük olması; alternatif tıpta ve ilaç endüstrisinde kullanımlarının günümüzde ciddi artışının altında yatan en önemli nedenleri arasındadır (Ramakrishna ve ark. 2021). Şifalı bitkilerin farklı kısımlarının ihtiva ettikleri sekonder metabolitlerden yararlanılarak; farklı modern ilaç preparatları hazırlanmakta ve bu preparatlar farklı ülkelerde bitkisel ilaçlar, bitkiseller, fitoterapötikler, fitofarmasötikler ve geleneksel ilaçlar gibi farklı şekillerde isimlendirilebilmektedir (Gezici and Sekeroglu, 2019a; Abdulridha ve ark., 2020; Ramakrishna ve ark. 2021).

Dünya genelinde 177 takson, Türkiye'de ise 39 takson ile temsil edilen ve Lamiaceae familyasının bir üyesi olan *Clinopodium* cinsi; sahip olduğu biyolojik özellikleri ve zengin fitokimyasal içeriği sayesinde geleneksel halk tıbbında dünya genelinde ve Türkiye'de yaygın bir kullanıma sahiptir (Türkiye Bitkiler Listesi, 2021; The Plant List, 2021). Bu cins Dünya üzerinde Doğu Akdeniz bölgesinde (Filistin, İsrail, Lübnan, Suriye, Ürdün ve Türkiye) doğal olarak yayılım göstermektedir. Türkiye'de ise; doğal olarak Doğu Karadeniz Bölümü, Yukarı Kızılırmak Bölümü, Antalya Bölümü, Adana Bölümü ve Dicle Bölümünde yayılım göstermektedir (Baytop, 1999; The Plant List, 2021). *Clinopodium* cinsinin zengin biyoaktif madde ve sekonder bileşiğe sahip olduğu daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Tuttolomondo et al., 2014; Tošić ve ark., 2015; Dunkić ve ark., 2017; Mohanty ve ark., 2017; Zhang ve ark., 2020). Bu cinse ait *C. dalmaticum,* C. pulegium, *C. serpyllifolium* ve *C. thymifolium* türleri ile ilgili olarak uçucu yağ bileşimini ortaya koymaya yönelik yapılan fitokimyasal analiz çalışmaları, bitkinin uçucu yağında %79.6–66.2 oranında oksijenli monoterpenler, menthone, pulegon gibi baskın mentan tipi bileşikler, piperitenon ve piperitenon oksit içerdiğini ortaya koymuştur. Bunlardan piperitenone (%38.73), piperitenon oksit (%34.8) ve pulegon (35.8), *C. serpyllifolium* türünün uçucu yağ bileşimini oluşturan temel komponentler olarak belirlenmiştir. Ayrıca, monoterpen hidrokarbonlar (%3.9–10.7) ve limonen (%3.2–6.2) bu türün uçucu yağında belirlenen diğer ana bileşenler olarak literatürde yer almıştır (Tošić ve ark., 2015; Dunkić ve ark., 2017).

Clinopodium türlerinden, *C. chinense* geleneksel Çin tıbbında binlerce yıldır diyabet, soğuk algınlığı, karaciğer ve ince bağırsak iltihabı, dizanteri, kabakulak, alerjik dermatit tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Zhang ve ark., 2020). Meksika'da *C. macrostemum* tıp alanında gastrointestinal bozukluklar, karın ağrısı, ishal ve öksürük tedavisinde kullanıldığı gibi; baharat, koku maddesi ve süsleme amacıyla da ticari olarak kullanılmaktadır (Tuttolomondo et al., 2014). *C. laevigatum* bitkisinin inflüsyon şeklinde hazırlanan çay olarak mide ağrılarında ve karaciğer hastalıklarının tedavisinde, *C. nepeta* ise hemostatik olarak kanamayı durdurucu ve dezenfektan olarak kullanılmaktadır (Tuttolomondo et al., 2014; Mohanty ve ark., 2017). Filistin'de tıbbi bitkiler üzerinde yapılan etnobotanik araştırmalar, *C. serpyllifolium* türünün; geleneksel halk tıbbında diyabet, hipertansiyon, öksürük, baş ve karın ağrısı, soğuk algınlığı, nefes darlığı, yara iyileştirici ve cilt hastalıkları dahil olmak üzere çeşitli rahatsızlıkları tedavi etmek için kullanıldığını ortaya koymuştur. Aynı zamanda geleneksel tıpta gevşetici ve hafıza arttırıcı olarak da kullanıldığı rapor edilmiştir (Ali-Shtayeh ve Jamous, 2008; Shehab ve Abu-Gharbieh, 2012; Ali-Shtayeh ve ark., 2018; Salameh ve ark., 2018; Salameh ve ark., 2020; El-Huneidi ve ark., 2020). Balkanlarda ise önemli bir etnobotanik değere sahip olan *C. gilliesii,* baharat olarak ve tıbbi amaçlarla karın ağrısı, soğuk algınlığı, yüksek tansiyon, kalp, menopoz ve kısırlık tedavisinde kullanılan bir bitkidir (Carvajal ve ark., 2017). Türk halk tıbbında *C. vulgare* geçmiş çağlarda savaş esnasında yaraları iyileştirmek amacıyla kullanıldığı literatürlerde yer almıştır (Kılıç ve ark., 2017). Bulgar bitkileri arasında da geleneksel tıpta kullanılan *C. vulgare* diyabet, mide ülseri, prostat, yaraların iyileştirilmesinde, cilt rahatsızlıklarında ve şişkinlik tedavisinde kullanılan çeşitli etnofarmokolojik uygulamalara sahip bir bitki türüdür (Batsalova ve ark., 2017; Bruno ve ark., 2019; Zheleva-Dimitrova ve ark., 2019). *C. polycephalum* bitkisinin toprak üstü kısımları rahim, burun, diş eti kanamalarında geleneksel bir halk ilacı olarak kullanılmaktadır (Kılıç ve ark., 2017). *C.*

bolivianum hazımsızlık, bulantı, ishal, anemi ve solunum yolu hastalıklarını tedavisinde ve aynı zamanda yemeklerde baharat olarak kullanılmaktadır (Solís-Quispe ve ark., 2018) *C. revolutum* karaciğer rahatsızlıklarında, safra kesesi taşlarında ve böbrek problemlerinde terapötik özellikleri için kullanılmaktadır (Ludeña 2017; Saldaña-Bobadilla ve ark., 2020). *C. brownei* ise Kolombiya, Küba, Venezuela ve Arjantin'de özellikle et yemeklerinde baharat olarak kullanılmakla birlikte; halk tıbbında soğuk algınlığı, şişkinlik, sindirim, balgam söktürücü ve antiseptik ilaç olarak kullanılmaktadır. (Pino ve ark., 1997; Jaramillo ve ark., 2010; Matailo ve ark., 2019). *C. rouyanum* türünün kalp ve mide rahatsızlıklarında kullanıldığı, ateş düşürücü, balgam söktürücü ve antiseptik özelliğe sahip olduğu gösterilmiştir (Ćavar ve ark., 2013; Dunkić ve ark., 2017; Tomas ve ark., 2019). *C. suaveolens* Kuzey Yunanistan'da sakinleştirici, idrar söktürücü ve antienflamatuar olarak; *C. graveolens* Türkiye'de (Denizli, Kütahya ve Balıkesir illerinde) soğuk algınlığına karşı bitkisel çay olarak tüketilmektedir. *C. acinos* bitkisi melankolide, nefes darlığı, diş ağrıları ve sindirim sistemi problemlerinde; *C. alpinum* ise İspanya'da öksürük giderici ve gastrointestinal rahatsızlıklarda iyileştirici etkisiyle yaygın olarak kullanılmaktadır (Kaya, 2019). *C. odorum* şişkinlik, idrar söktürücü, kabızlık, mide rahatsızlıklarında, uyarıcı, uyutucu, adet baskılayıcı, baş ve karın ağrısında ayrıca doğum sırasında da kullanılmaktadır. (Harley ve Paucar, 2000; Mahady 2005; Barboza ve ark., 2009; Vázquez ve ark 2014).

Sunulan çalışmada, bütünleyici ve tamamlayıcı tıp açısından oldukça önem arz eden, Gaziantep ili çevresinde doğal olarak yayılış gösteren ve halk arasında 'taş nanesi' olarak bilinen *C. serpyllifolium* subsp*. serpyllifolium* bitkisinin çiçek ve gövde kısımlarından elde edilen farklı ekstrelerin akciğer ve beyin glioma kanser hücre hatları üzerinde apoptoz ve nekroz aracılıklı biyolojik aktiviteleri detaylı olarak araştırılmıştır. *C. serpyllifolium* subsp*. serpyllifolium* bitkisi; geleneksel halk tıbbında mide rahatsızlıkları, solunum yolu hastalıkları, diyabet, hipertansiyon, öksürük, baş ve karın ağrısı, cilt hastalıklarının tedavisinde, yaraların iyileştirmesinde çok uzun yıllardan bu yana kullanıma sahip olmasına rağmen, bitki türü ile ilgili yapılan literatür araştırmaları doğrultusunda kapsamlı biyolojik aktivite analizlerinin yapılmamış olması, sitotoksik etki göstererek kanser hücrelerinde hücre proliferizasyonunu baskılayıcı etkileri ve apoptotik hücre ölümünü indükleyerek kanser gelişimini engelleyecek potansiyele sahip olup olmadığı ile ilgili literatür verilerine rastlanmamış olması nedeniyle *C. serpyllifolium* subsp*. serpyllifolium* bitkisinin apoptoz ve nekroz aracılıklı antikanser, antiapoptotik, sitotoksik ve apoptotoik aktiviteleri detaylı olarak araştırılmıştır. Bu çalışmadan elde edilen verilerin, daha sonra yapılacak olan *in vivo* ve/veya klinik araştırmalara öncül veri sağlayacak potansiyele sahip olduğu ve bu alanda yapılacak olan çalışmalara ışık tutacak nitelikte olduğu düşünülmektedir.

MATERYAL ve METOD

Bitki Materyalinin Toplanması

Çalışma kapsamında, Lamiaceae familyasına ait olan *C. serpyllifolium* subsp. *serpyllifolium* (M.Bieb.) Kuntze bitkisi kullanılmıştır. Bitki materyali Gaziantep ili Yukarı Arıl köyü kırsalından (37.125206N ve 37.572971E) taksonomist botanikçi Arş. Gör. Fatih YAYLA (Gaziantep Üniversitesi, Biyoloji Bölümü) tarafından çiçeklenme dönemi içinde Haziran-Temmuz aylarında toplanmış ve sistematik olarak teşhis edilmiştir. Bitki herbaryum örneği, Gaziantep Üniversitesi Biyoloji Bölümü Herbaryumu'nda (GAUNHERB) GAUN 5056 herbaryum numarası ile kayıt altına alınmıştır. Bitkinin çiçek ve gövde kısmını ihtiva eden toprak üstü kısımları, nemsiz ve karanlık ortamda, oda ısısında kurutulmuştur. Bitki türünün kısımlarını ihtiva eden, doğal flora ortamında çekilmiş görüntüsü Şekil 1'de verilmiştir.

Bitki Ekstraktlarının Elde Edilmesi

Bitki materyalinin kurutulmuş çiçek ve yapraklarını da ihtiva eden gövde kısımları toz hale getirilmiş ve her bir bitki kısmı distile su (dH_2O) ve %70'lik etanol (C_2H_5OH-EtOH) çözücüleri kullanılarak maserasyon yöntemi ile özütlenmiştir (Senol ve ark., 2018; Gezici ve Sekeroglu, 2019b). Maserasyon işleminin ardından bitki özütleri filtre kâğıdı yardımı ile süzülmüş ve EtOH özütlerindeki çözücü rotary evaporatör yardımı ile buharlaştırılmış ve liyofilizatörde kurutma işlemi gerçekleştirilmiştir. Toz hale getirilen bitki özütleri sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -20 ^{o}C derin dondurucuda saklanmıştır. Analizlerde kullanılan bitki ekstreleri, en yüksek konsantrasyonları 1 mg mL^{-1} olacak şekilde DMSO (dimetil sülfoksit) içerisinde çözülerek homojen hale getirilmiştir (Gezici, 2019). Elde edilen ekstrelerin verim yüzdeleri, [(kuru ekstrakt ağırlığı / kuru bitki materyali ağırlığı) × 100] formülüne göre hesaplanmıştır (Gezici ve Sekeroglu, 2022).

Akciğer ve Beyin Glioma Hücre Hatlarının Temin Edilmesi

Bitki ekstrelerinin *in vitro* antikanser, antiproliferatif ve apoptotik aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla ATCC (Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu, ABD)'den satın alınan hücre hatları kullanılmıştır. Çalışmada A549 (akciğer karsinoma), H1299 (küçük hücreli

olmayan akciğer kanseri) ve C6 (beyin glioma) kanser hücre hatları ile kanserli olmayan HUVEC (insan göbek ven endotel hüceleri) kontrol hücre hattı kullanılmıştır. Hücre kültür ortamlarının hazırlanmasında kullanılan besiyerleri önceki makalelerde belirtildiği şekilde hazırlanmıştır (Gezici ve ark., 2017; Gezici, 2019). Bu kapsamda C6 ve HUVEC hücre hatları; genel olarak %10 FBS (fetal sığır serumu), %1 antibiyotik (100U/mL penisilin-100µg/mL streptomisin) ve %1 L-glutamin içeren 5 mL DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium):Ham's F12 (1:1) besiyeri ortamı içerisinde; A549 ve H1299 akciğer hücre hatları ise RPMI 1640 (Roswell ParkMemorial Institute Medium) besiyeri içerisinde kültüre alınmıştır.



Şekil 1. *Clinopodium serpyllifolium* subsp. *serpyllifolium* (M.Bieb.) Kuntze bitkisinin genel görünümü
Figure 1. General view of Clinopodium serpyllifolium subsp. serpyllifolium (M.Bieb.) Kuntze

Antikanser Aktivite Analizleri

Bitki materyalinin çiçek ve gövde kısmından farklı çözücüler kullanılarak elde edilen özütlerin, antikanser ve sitotoksik etkilerinin belirlenmesi için; hücre canlılığının kolorimetrik olarak ölçülmesi esasına dayanan MTT (3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) - 2,5-diphenyltetrazolium bromide) yöntemi, üzerinde kısmen modifikasyonlar yapılarak uygulanmıştır (Mosmann ve ark., 1983; Gezici, 2019). Kültür ortamlarına her bir ELISA kuyucuğunda 5 x 10^3 hücre olacak şekilde ekimi yapılan ve 37°C'de, %5 CO_2 içeren ortamda inkübasyona bırakılan hücre soyları (A549, H1299, C6 ve HUVEC), uygun oranlarda hazırlanan MTT çözeltisi ile muamele edilmiştir. MTT solüsyonuna tabi tutulan hücrelerde mavi-mor renkli formazan kristallerinin oluşumuna bağlı olarak meydana gelen absorbans değerleri spektrofotometre (Thermo Scientific Multiskan Go) ile 570 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Çalışmaya dahil edilen her bir ekstrakt ve hücre hattı için IC_{50} (µg mL^{-1}) değerleri hesaplanmıştır.

Antiproliferatif Aktivite Analizler

Bitki ekstrelerinin sahip oldukları antiproliferatif kapasitelerinin ortaya konulması amacıyla; membran bütünlüğü bozulmuş hücrelerin non-vital bir boya olan tripan mavisi ile boyanması esasına dayanan tripan mavisi metoduna göre yapılmıştır (Strober, 2015). Bu yöntemde hücre kültür ortamlarında çoğaltılan ve farklı konsantrasyonlarda bitki ekstrelerine maruz bırakılan A549, H1299, C6 ve HUVEC hücre hatları, tripan mavisi çözeltisi ile muamele edilmiş ve 37 °C'de 24, 48 ve 72 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon periyodlarının ardından, hücre hatlarındaki canlı ve ölü hücreler, hücre sayım cihazı (Cedex XS Analyzer, Roche) ile sayılarak, hücrelerdeki yüzde (%) canlılık oranları hesaplanmıştır.

Apoptotik Aktivite Analizleri

Apoptotik hücre ölümünün belirlenmesi amacıyla; farklı konsantrasyonlarda (0 ile 100 µg mL^{-1}) bitki ekstraktı ile muamele edilen A549, H1299 ve C6 kanser hücrelerinde meydana gelen parçalanmış ve sitoplazmaya geçmiş mononükleozomları ya da oligonükleozomları saptamaya yönelik, immünolojik temelli ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) testi uygulanmıştır (Hingst ve Blottner, 1995). Bu yöntemde; 5x10^4 mL^{-1} hücre ihtiva eden kültür ortamları farklı konsantrasyonlarda bitki ekstraktı

ile muamele edildikten sonra yaklaşık 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Apoptotik hücrelerin sitoplazmalarında bulunan nükleozomlar, CDD-ELISA kiti (Cell Death Detection ELISA^{PLUS}, Roche) kullanılarak belirlenmiştir. Çalışmada her bir örnek ve kontrol için üç tekrar yapılarak 405 nm dalga boyundaki absorbans değerlerinin ortalaması alınmış ve aşağıda verilen eşitliğe göre rölatif absorbans değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen değer, her bir örnekteki mono ve oligo-nükleozom miktarının kontroldekine oranını ifade etmektedir.

$$Rölatif\ Absorbans\ Değeri = A_1/A_2 \quad (1)$$

Verilen eşitlikte; A_1= Bitki ekstresi uygulanan hücrelerin absorbans değerlerinin ortalaması ve A_2= Kontrol hücrelerinin 405 absorbans değerlerinin ortalamasıdır. Elde edilen değer, her bir örnekteki mono- ve oligo-nükleozom miktarının kontroldekine oranını ifade etmektedir.

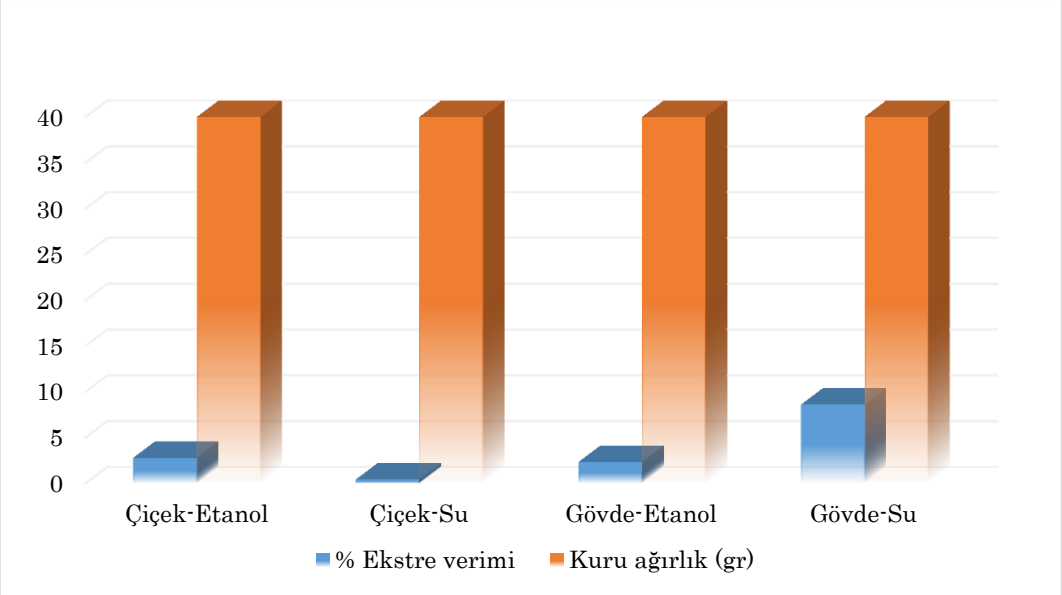
İstatistik Analizler

Analizler en az üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiş ve istatistiksel olarak standart ortalama ve standart sapma (ortalama ± SS) şeklinde hesaplanmıştır. İstatistiksel analiz için GraphPad Instat version 3.05 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, ABD) kullanılmıştır. Student's-*t* testi, ikili grupların ortalamalarının karşılaştırılmasında kullanılırken; üçlü grupların ortalamalarının karşılaştırılmasında ise ANOVA yapılmıştır. Elde edilen skorlar Mann-Whitney U testi ile değerlendirilmiştir. İstatistiksel olarak $P < 0.05$ güven aralığından küçük olan veriler anlamlı; $P < 0.01$ güven aralığından küçük olan veriler ise çok anlamlı olarak kabul edilmiştir (*$P < 0.05$; **$P < 0.01$).

BULGULAR

Ekstre Verimliliğine İlişkin Bulgular

Gaziantep ili ve çevresinde doğal olarak yayılış gösteren *Clinopodium serpyllifolium* subsp. *serpyllifolium* bitkisinin dH_2O ve EtOH çözücüler kullanılarak çiçek ve gövde kısımlarından elde edilen ekstrelerin, başlangıç miktarları ve ekstraksiyon sonrası elde edilen miktarlarına bağlı olarak elde edilen ekstre verimlilikleri yüzde (%gr gr^{-1}) olarak Şekil 2'de verilmiştir. Bitki türünün gövde kısmından elde edilen yüzde (%) ekstrakt veriminin çiçek kısmından elde edilen ekstraktlara göre daha fazla olduğu ve en yüksek verimin gövde kısmından dH_2O kullanılarak elde edilen ekstraklarda (%8.59) olduğu görülmektedir (Şekil 2).



Şekil 2. Bitkinin yüzde (%gr gr^{-1}) ekstre verimliliği
Figure 2. Percentage (gr gr^{-1} %) extract yield of the plant

Antikanser Aktiviteye İlişkin Bulgular

C. serpyllifolium subsp. *serpyllifolium* bitkisinin farklı kısımlarından elde edilen bitki ekstrelerinin A549, H1299 ve C6 kanser hücre hatlarına karşı sitotoksik aktivite potansiyeline bağlı olarak kanser gelişimi üzerine etkinlikleri doz ve zamana bağlı olarak analiz edilmiş ve test edilen her bir ekstre için hücrelerin %50'sinin çoğalmasını inhibe etmek için gerekli olan doz miktarı hesaplanmıştır. Çalışmadan elde edilen bulgular IC_{50} (µg/mL) ± S.S. (standart sapma) olarak Çizelge 1'de sunulduğu gibidir.

Bitkinin çiçek ve gövde kısımlarının antikanser aktivitesini belirlemeye yönelik yapılan analizlerde, ekstrelerin 5.28±0.10 µg ml^{-1} ile 37.92±1.18 µg ml^{-1} arasında değişen IC_{50} değerleriyle güçlü sitotoksik etkiye sahip oldukları ve A549, H1299 ve C6 olmak

üzere her üç kanser hücrelerdeki, hücre canlılık aktivitelerinin azaltarak, hücreleri ölüme teşvik ettiği gözlenmiştir. Çalışma bulguları doğrultusunda; bitkinin çiçek ve gövde kısımlarından elde edilen bitki özütleri en yüksek oranda A549 hücre hattına (IC_{50}=5.28±0.10–10.20±0.51 µg ml^{-1}) karşı etkili bulunurken; C6 (IC_{50}=25.63±0.40– 37.92±1.18 µg ml^{-1}) hücre hatlarına karşı ise en düşük oranda antikanser aktivite gösterdiği ortaya konulmuştur. *C. serpyllifolium* subsp. *serpyllifolium* bitkisinin kullanılan farklı kısımlarına göre ise; çiçek kısmının 5.28±0.10 ile 28.01±0.64 µg ml^{-1} aralığında değişen IC_{50} değerleri ile gövde kısmına kıyasla daha yüksek antikanser aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir (Çizelge 1).

Çizelge 1. Bitki ekstrelerinin akciğer kanseri ve beyin glioma hücre hatlarına karşı antikanser aktiviteleri
Table 1. Anticancer activities of plant extracts against lung and brain glioma cell lines

Hücre hatları *Cell lines*	Bitki kısımları ve özütler *Plant parts and extracts*		IC_{50} değerleri [a] (µg mL^{-1}) *IC_{50} values [a] (µg mL^{-1})*
A549	Çiçek (*Flower*)	EtOH	6.40 ± 0.47**
		dH_2O	5.28 ± 0.10**
	Gövde (*Stem*)	EtOH	10.20 ± 0.51*
		dH_2O	9.15 ± 0.36**
H1299	Çiçek (*Flower*)	EtOH	14.78 ± 1.03*
		dH_2O	14.05 ± 0.76**
	Gövde (*Stem*)	EtOH	20.98 ± 0.24**
		dH_2O	18.32 ± 0.09*
C6	Çiçek (*Flower*)	EtOH	28.01 ± 0.64*
		dH_2O	25.63± 0.40**
	Gövde (*Stem*)	EtOH	37.92 ± 1.18**
		dH_2O	30.07 ± 1.23**
HUVEC	Çiçek (*Flower*)	EtOH	9.08 ± 0.90**
		dH_2O	7.23 ± 0.05**
	Gövde (*Stem*)	EtOH	15.02 ± 0.34*
		dH_2O	12.61 ± 0.56**
Doksorubisin [b]			7.04 ± 0.29

[a] Veriler IC_{50} (µg mL^{-1}) ± S.S. (standart sapma) olarak ifade edilmiştir (n=3).
[b] Doksorubisin, pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.
*P < 0.05 ve ** P < 0.01

Antiproliferatif Aktiviteye İlişkin Bulgular

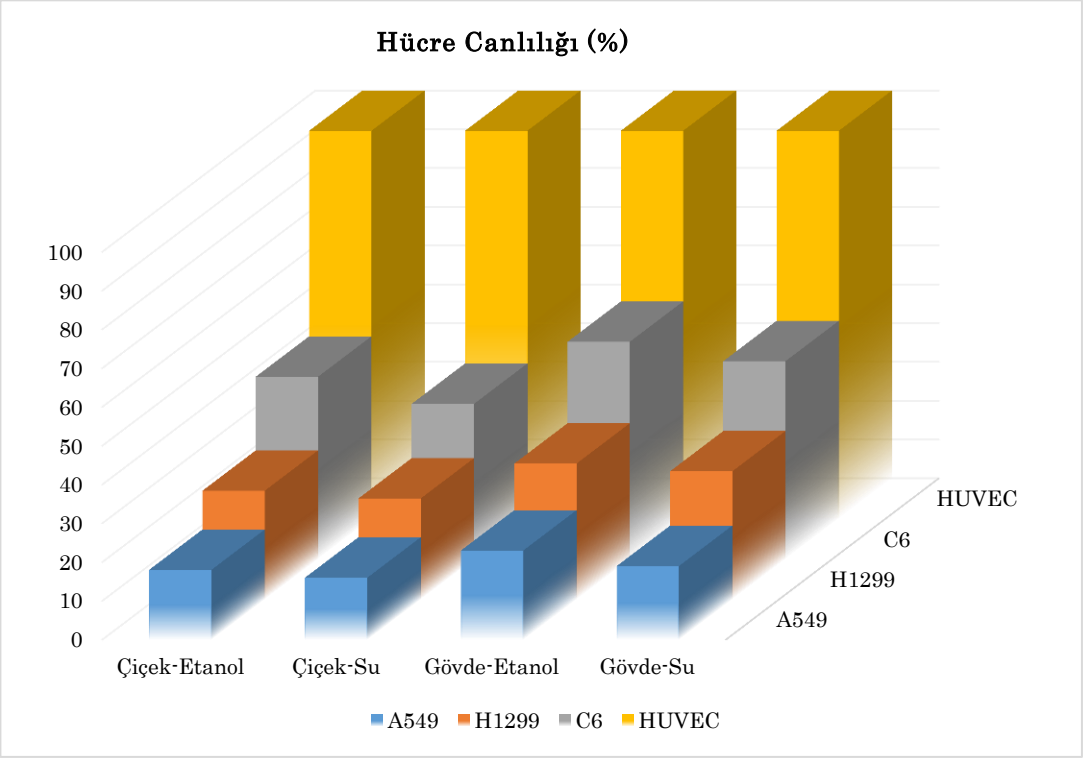
Bitkinin çiçek ve gövde kısmından elde edilen farklı ekstrelerin antiproliferatif aktiviteleri; A549, H1299 ve C6 kanser hücrelerinde hücrelerin canlılıkları üzerine etkileri konsantrasyon ve muamele sürelerine bağlı olarak analiz edilmiştir. Hücreler, 24, 48 ve 72 saat olmak üzere farklı zaman aralıklarında, uygulanan ekstre konsantrasyonuna bağlı olarak sayılmış ve kanserli hücre soylarından elde edilen hücre canlılık oranları, kontrol hücre hattı olan HUVEC hücrelerindeki canlılık oranları ile kıyaslanmıştır. Çalışma kapsamında, 48 saat ekstre uygulaması sonrasında elde edilen bulgular yüzde (%) hücre canlılığı olarak Şekil 3'te verilmiştir.

MTT analizlerinden elde edilen bulgulara benzer şekilde; *C. serpyllifolium subsp. serpyllifolium* bitkisinin çiçek kısmından dH_2O kullanılarak hazırlanan ekstrakt, kanser hücrelerinde hücre çoğalmasını en yüksek oranda engelleyen ve böylece güçlü antiproliferatif aktivite gösteren bitki ekstraktı olarak tespit edilmiştir. Bitki materyalinin gövde kısmından EtOH ile elde edilen ekstrakt ise; test edilen her üç hücre hattında da en az antiproliferatif kapasiteye sahip özüt olarak belirlenmiştir. Bitkiden elde edilen farklı ekstrelerin genel olarak hücre canlılıkları değerlendirildiğinde ise, %16-23 arasında değişen hücre canlılık oranlarıyla hücre canlılığının en yüksek oranda azaltılabildiği kanserli hücre hattının A549; en az azaltılabildiği hücre hattının ise %40-56 arasında değişen canlılık oranları ile C6 hücreleri olduğu belirlenmiştir (Şekil 3).

Apoptotik DNA Fragmentasyonuna İlişkin Bulgular

Farklı konsantrasyonlarda özütler ile muamele edilen A549, H1299 ve C6 kanser hücre soylarında antijen-antikor kompleksi esasına dayanan ELISA testi ile apoptoz seviyesi ölçülmüştür. Sunulan çalışmada, doksorubisin pozitif kontrol olarak kullanılırken; bitki ekstraktı ile muamele edilmemiş olan hücreler ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Bulgular, farklı dozlarda bitki ekstresi uygulanan hücre örneklerinden elde edilen veriler ile kıyaslanmış ve uygulanan tüm bitki konsantrasyonları için negatif kontrole kıyasla istatistiksel açıdan çok önemli ($P < 0.01$); pozitif kontrol olarak kullanılan doksorubisine oranla da önemli ($P < 0.05$) olarak bulunmuştur. Ayrıca, bitkinin her iki aksamından elde edilen bitki ekstrelerinin, A549, H1299 ve C6 olmak üzere her üç kanser hücre hattında da muamele edilen ekstre konsantrasyonuna bağlı olarak apoptotik hücre

ölümünü artırdığı belirlenmiştir. Uygulanan farklı ekstre konsantrasyonlarına göre, apoptotik DNA fragmentasyonuna bağlı olarak elde edilen apoptotik hücre ölüm seviyelerindeki değişimler her bir hücre hattı için rölatif absorbans değerleri olarak Çizelge 2'de gösterilmektedir.



Şekil 3. Bitki ekstrelerinin akciğer ve beyin glioma hücre hatlarında hücre canlılık oranları
Figure 3. Cell viability rates of the plant extract in lung and brain glioma cell lines
* Veriler 48 saat uygulama sonrasında hücrelerdeki yüzde canlılık olarak ifade edilmiştir.
** HUVEC hücreleri kontrol hücreler olarak kullanılmış ve canlılık oranları %100 olarak kabul edilmiştir.

Apoptotik hücre ölümü üzerine *C. serpyllifolium* subsp. *serpyllifolium* bitki ekstrelerinin etkinliğinin ortaya konulduğu bu çalışmada, antikanser ve antiproliferatif aktivite bulgularına benzer şekilde; apoptotik hücre ölümünün en fazla gerçekleştiği hücre hattının A549 hücreleri olduğu tespit edilmiş ve bunu sırasıyla H1299 ve C6 hücrelerinin takip ettiği belirlenmiştir. Ayrıca, 100 µg mL^{-1} konsantrasyonda test edilen tüm ekstrelerin A549 hücre soylarında aynı dozda doksorubisinden daha etkili bir şekilde mono ve oligonükleozom oluşumunu artırarak apoptozu tetikleyebildiği gözlenmiştir. Aynı dozun, HUVEC kontrol hücrelerinde hücre canlılığını etkilemediği de çalışmalarda ortaya konulan bulgular arasındadır. Çalışmada kullanılan hücre hatlarında apoptotik DNA fragmentasyonuna bağlı olarak gözlenen mono ve oligonükleozom miktarının, dH_2O-çiçek ekstrelerinde en yüksek; EtOH-gövde ekstrelerinde ise apoptotik etkinin en düşük olduğu belirlenmiştir.

TARTIŞMA

Kanser, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerin her ikisinde de günümüzün en önemli sağlık sorunlarından biri haline gelmiştir. Oluşum mekanizmaları, gelişimi ve sonuçları açısından kanser; bireyler arasında farklı süreçler ile karakterize edilen, hücresel ve moleküler düzeyde heterojenite ve çeşitlilik gösteren multifaktöryel bir hastalıktır (Tewary ve ark., 2017). Kanser, hücrelerin aşırı ve zamansız çoğalmalarına, immün sistemin gözetiminden kaçmalarına ve nihai olarak da uzaktaki dokuları da istila ederek metastazlar oluşturmalarına yol açan metabolik ve davranışsal değişikliklerin meydana geldiği çok basamaklı bir süreçtir (Searle ve ark., 1982; Sung ve ark., 2021). Bu süreç, büyüme baskılayıcılarından kaçınma, immün yıkımdan korunma, genom kararsızlığı ve mutasyon, hücre ölümüne (apoptoza) direnç, anjiyogenezin indüklenmesi, proliferatif sinyallerin bozulması, replikatif ölümsüzlük, tümör teşvik edici inflamasyon, hücresel enerji mekanizmasının bozulması, invazyon aktivasyonu ve metastaz oluşumu ile karakterizedir (Hanahan ve Weinberg, 2011). Sağlıklı hücrelerde, metabolizmada hücrelerin büyümesi ve çoğalması bir düzen içerisinde ve çeşitli kontrol basamaklarının kontrolü dahilinde gerçekleşmektedir. Ancak kanser durumunda, hücreler anormal şekil ve hızda büyümeye ve kontrolsüz şekilde çoğalmaya başlayarak, tümör adı verilen kitle oluşumuna yol açmakta, buna paralel olarak doku ve organlar da görevlerini normal olarak

yerine getirememektedir (Smith ve Simons, 2018; Ramakrishna ve ark., 2021).

Tıbbi ve aromatik bitkiler ihtiva ettikleri zengin biyoaktif bileşikler ve sekonder metabolitler ile kanser başta olmak üzere pek çok hastalığın tedavisinde ve gelişiminin engellenmesinde 'tamamlayıcı tıp (bitkisel tedavi)' olarak yadsınamaz derecede önem arz etmektedir. Yapılan araştırmalar sadece kanser hastalarında değil, sağlıklı bireylerde de bitkisel ürün kullanımına yönelik artan bir ilginin olduğunu göstermektedir (Greenwell ve Rahman, 2015; Roy ve ark., 2018; Gezici ve Sekeroglu, 2019a). Bu doğrultuda, tamamlayıcı tıp alanında da önem arz eden *Clinopodium serpyllifolium* subsp. *serpyllifolium* bitkisinin, çiçek ve gövde kısımları farklı çözücüler ile ekstrakte edilen özütler kullanılarak antikanser, antiproliferatif ve apoptotik aktivitelerinin ortaya konulduğu bu çalışmadan elde edilen veriler ışığında, tıp alanında kanser araştırmalarında ve farmasötik alanda ilaç yapımında kullanılma potansiyelinin literatüre kazandırıldığı düşünülmektedir.

Çizelge 2. Bitki ekstrelerinin akciğer ve beyin glioma hücre hatlarında apoptotik hücre ölümü üzerine etkileri
Table 2. Effects of the plant extracts on apoptotic cell death in lung and brain glioma cells

	Bitki özüt Konsantrasyonları *(Concentrations of the plant extract)*	**Absorbans Değeri [a] ± Standart Sapma** *(Absorbance [a] ± Standard Deviation)*			
		Çiçek-EtOH	Çiçek-dH_2O	Gövde-EtOH	Gövde-dH_2O
A549 Hücre Hattı (A549 Cell Line)	0 µg mL^{-1} [b]	0.968±0.002	0.830±0.045	0.874±0.016	0.801±0.098
	10 µg mL^{-1}	2.382±0.056	2.590±0.008	2.040±0.010	2.083±0.002
	20 µg mL^{-1}	3.270±0.028	4.028±0.091	3.005±0.076	3.296±0.036
	50 µg mL^{-1}	4.102±0.014	4.805±0.007	3.941±0.025	4.069±0.021
	100 µg mL^{-1}	5.351±0.080	5.648±0.050	5.062±0.019	5.302±0.095
	Doksorubisin [c]	5.021±0.012 (100µg/mL konsantrasyonda)			
	Bitki özüt Konsantrasyonları *(Concentrations of the plant extract)*	**Absorbans Değeri [a] ± Standart Sapma** *(Absorbance [a] ± Standard Deviation)*			
H1299 Hücre Hattı (H1299 Cell Line)		Çiçek-EtOH	Çiçek-dH_2O	Gövde-EtOH	Gövde-dH_2O
	0 µg mL^{-1} [b]	0.902±0.035	0.845±0.017	0.904±0.088	0.851±0.052
	10 µg mL^{-1}	1.640±0.007	1.651±0.090	1.325±0.010	1.412±0.024
	20 µg mL^{-1}	2.561±0.054	2.963±0.027	2.110±0.049	2.408±0.095
	50 µg mL^{-1}	3.258±0.006	4.037±0.039	2.851±0.070	3.170±0.016
	100 µg mL^{-1}	4.369±0.078	4.805±0.066	3.967±0.021	4.164±0.003
	Doksorubisin [c]	4.016±0.037 (100µg/mL konsantrasyonda)			
	Bitki özüt Konsantrasyonları *(Concentrations of the plant extract)*	**Absorbans Değeri [a] ± Standart Sapma** *(Absorbance [a] ± Standard Deviation)*			
C6 Hücre Hattı (C6 Cell Line)		Çiçek-EtOH	Çiçek-dH_2O	Gövde-EtOH	Gövde-dH_2O
	0 µg mL^{-1} [b]	0.876±0.092	1.001±0.064	0.811±0.001	0.780±0.050
	10 µg mL^{-1}	1.395±0.015	1.624±0.077	0.948±0.009	1.014±0.061
	20 µg mL^{-1}	2.240±0.060	2.650±0.083	1.645±0.079	2.060±0.014
	50 µg mL^{-1}	2.820±0.080	3.142±0.020	2.340±0.036	2.785±0.010
	100 µg mL^{-1}	3.180±0.071	3.592±0.011	2.701±0.009	2.974±0.006
	Doksorubisin [c]	3.925±0.049 (100µg/mL konsantrasyonda)			

[a] Veriler 24 saat uygulama sonrasında hücrelerdeki DNA fragmentasyonunu ifade eden mono ve oligonükleozom zenginleşmesi ± standart sapma olarak ifade edilmiştir.
[b] 0 µg mL^{-1} özüt uygulanan hücreler, negatif kontrol olarak kullanılmıştır.
[c] Doksorubisin (100 µg ml^{-1}), pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Bitkinin sitotoksik kapasitesine bağlı olarak antikanser özelliğinin ortaya konulmasına yönelik Shehab ve Abu-Gharbieh (2012) tarafından yapılan çalışmada bitkinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan su ekstresinin ve yağının insan kolorektal (HCT-116) ve insan meme (MCF-7) kanseri hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Yapılan çalışmada bitkinin yağının HCT ve MCF-7 hücrelerinde sırasıyla 10 µg ml^{-1} ve 12.7 µg ml^{-1} IC_{50} değerleri en yüksek oranda sitotoksik etkiyi gösterirken, su özütü ise HCT ve MCF-7 hücrelerinde sırasıyla 11 µg ml^{-1} ve 19.6 µg ml^{-1} IC_{50} değerleri ile

en az sitotoksik etkiyi göstermiştir. Ayrıca El-Huneidi ve ark. (2020) tarafından, bitki türünün farklı konsantrasyonlardaki ekstrelerinin insan meme (MCF-7) ve kolorektal (HCT-116) kanser hücre hatları üzerindeki sitotoksik aktiviteleri; MCF-7 hücrelerine karşı 99.7 µg ml^{-1} ve 208.9 µg ml^{-1} aralığında değişen IC_{50} değerleri ile, HCT-116 hücrelerine karşı ise sırasıyla 98.8 µg ml^{-1} ve 403.8 µg ml^{-1} arasında değişen IC_{50} değerleri ile belirlenmiştir. Çalışma kapsamında araştırılan bitki ekstrelerinin sahip olduğu güçlü sitotoksik etkinin, bitkinin ihtiva ettiği fenolik asitlerden, flavonoidlerden, monoterpen ve seskiterpen olmak üzere zengin biyoaktif bileşenlerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

C. serpyllifolium subsp. *serpyllifolium* bitkisinin farklı hücre hatlarına karşı antiproliferatif kapasitelerinin ortaya konulmasına yönelik yapılan önceki çalışmalarda, bitkinin sulu ekstresinin insan globlastoma (U-87) hücre hattında önemli ölçüde hücre canlılığını azaltarak antiproliferatif aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Koç ve ark., 2017). Bitkinin etanol ekstresinde RP-HPLC ile belirlenen fenolik asit (gallik asit, kafeik asit, vanilik asit, ferulik asit) ve flavonoid (kuersetin, rutin, kaempferol, apigenin) bileşiklerinin çeşitli kanser hücrelerinde hücre canlılığını azalttığı gösterilmiştir (Kampa ve ark., 2004; Mutalib ve ark., 2016). Bitkinin uçucu yağı ile yapılan başka bir çalışmada, pulegone (%33.40) bileşiğinin M14, A2058 ve A375 hücreleri üzerinde; linool (%30.29) bileşiğinin ise A549 ve HepG2 hücre hatları üzerinde konsantrasyona bağlı olarak antiproliferatif etki gösterdiği bildirilmiştir (Telci ve Ceylan, 2007; Kladniew ve ark., 2014; Russo ve ark., 2016). Yine bitkinin uçucu yağındaki ana bileşenlerden piperitone, piperitone oksit, α-pinen, ß-pinen bileşiklerin kanserli hücre hatlarında proliferizasyonun baskılanmasına katkı sağladığı yönünde çalışmalar mevcuttur (Lampronti ve ark., 2006; Sobral ve ark., 2014; Yagi ve ark., 2016). Bitkinin uçucu yağ ve ekstrelerinde bulunan zengin aktif bileşenlerin, güçlü antiproliferatif aktivite üzerinde önemli ölçüde etkisi olduğu görülmektedir. Bitkinin farklı kısımlarından distile su ve etanol çözücüleri kullanılarak elde edilen ekstraktların A549, H1299 ve C6 hücre hatlarında hücrelerin çoğalmasını engelleyerek ve hücrelerin canlılığını azaltıcı yöndeki güçlü etkileri, literatürde yer alan önceki raporlar ile uyumlu olduğu görülmüştür.

DNA hasarına bağlı olarak *C. serpyllifolium* subsp. *serpyllifolium* bitki ekstrelerinin apoptotik hücre ölümünü teşvik edici kapasitelerinin de araştırıldığı bu çalışmada literatür açısından ilk kez tarafımızca gerçekleştirilmiştir. Ekstraktların sahip olduğu apoptotik aktivite; bitkinin bünyesinde yüksek miktarda bulunan kuersitrin (%4.72), ferulik (%4.30), rozmanirik (%4.23) ve benzoik asit (%2.08) başta olmak üzere fenolik asitler, flavonoidler ve uçucu yağındaki diğer bileşikler ile açıklanabilir (Zhang et al., 2018; El-Huneidi ve ark., 2020).

SONUÇ ve ÖNERİLER

Son yıllarda yapılan araştırmalar doğrultusunda, tıbbi aromatik bitkiler ve bitkilerden elde edilen biyoaktif bileşenlerin insan sağlığı üzerinde oldukça faydalı biyolojik etkilere sahip olduğu görülmektedir. Özellikle endojen ve ekzojen kaynaklı serbest radikal türlerinin neden olduğu oksidatif stresin; kanser, diyabet, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar başta olmak üzere pek çok hastalığın oluşumuna ve gelişimine yol açtığı bilinmektedir. Tıbbi ve aromatik bitkiler ile diyetle alınan doğal bileşikler ise; serbest radikal türlerinin neden olduğu oksidatif hasarları nötralize edebilecek bileşikler ihtiva etmektedir. Özellikle tamamlayıcı tıp alanında pek çok hastalığın seyrinin yavaşlatılmasında ve tedavisinde, tıbbi özelliğe sahip bitkiler ve bu bitkilerden izole edilen etken maddelerin oldukça önemli bir yere sahip olduğu görülmektedir. Bu bağlamda, Gaziantep ve çevresinde doğal olarak yetişmekte olan ve halk arasında 'taş nanesi' olarak bilinen *Clinopodium serpyllifolium* subsp. *serpyllifolium* bitkisinin çiçek ve gövde kısımlarından farklı çözücüler kullanılarak elde edilen ekstrelerin antikanser, antiproliferatif ve apoptotik aktiviteleri ortaya konulmuştur. Bitki türü ile ilgili yapılan literatür taramaları doğrultusunda kanser gelişimini önleyici etkiye sahip olup olmadığını ortaya koyan herhangi bir çalışmaya rastlanmadığından, sunulan çalışmadan elde edilen bulgular literatüre yeni bilgiler kazandırma potansiyelindedir. Bu çalışmadan elde edilen bulgular doğrultusunda, çalışılan bitki türü kanser hücrelerinde sitotoksisiteye bağlı olarak hücre çoğalmasını engelleyici ve apoptotik hücre ölümünü teşvik edici etkisiyle tıp ve farmasötik alanlarında daha sonra yapılacak olan çalışmalara ön veri sunmaktadır.

TEŞEKKÜR

Sunulan çalışma Kilis 7 Aralık Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Yönetim birimi tarafından finansal olarak desteklenmiştir (Proje kodu: 1928MAP1).

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti

SG: Çalışma alt yapısının hazırlanması, laboratuvar analizlerinin gerçekleştirilmesi, istatistiksel hesaplamaların yapılması ve makalenin yazılması; DK: Bitki ekstrelerinin hazırlanması ve literatürlerin taranması; FY: Bitki materyal temini ve taksonomik açıdan bitkinin tanımlanması; NS: Çalışma fikrinin ortaya atılması ve makalenin düzenlenmesi. Tüm yazarlar makalenin son halini okumuş ve yayınlanması için onay vermişlerdir.

Çıkar Çatışması Beyanı

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

KAYNAKLAR

Abdulridha MK, Al-Marzoqi AH, Al-Awsi GRL, Mubarak SM, Heidarifard M, Ghasemian A 2020. Anticancer effects of herbal medicine compounds and novel formulations: a literature review. Journal of Gastrointestinal Cancer. 51: 765-773

Ali-Shtayeh MS, Jamous RM 2008. Traditional Arabic Palestinian Herbal Medicine, TAPHM. Til, Nablus, Palestine, Biodiversity and Environmental Research Center, BERC. ISBN 978-9950-324-04-6

Ali-Shtayeh MS, Jamous RM, Abu-Zaitoun SY, Akkawi RJ, Kalbouneh SR, Bernstein N, Dudai, N 2018. Chemical profile and bioactive properties of the essential oil isolated from *Clinopodium serpyllifolium* (M. Bieb.) Kuntze growing in Palestine. Industrial Crops and Products 124: 617-625.

Barboza GE, Cantero JJ, Núñez C, Ariza Espinar L, Pacciaroni ADV 2009. Medicinal plants: A general review and a phytochemical and ethnopharmacological screening of the native Argentine Flora. Kurtziana. 34(1): 12-20.

Batsalova T, Bardarov K, Bardarov V, Moten D, Dzhambazov, B 2017. Cytotoxic properties of *Clinopodium vulgare* L. extracts on selected human cell lines. Comptes Rendus l'Académie Bulgarian Des Science. 70(5): 645-650.

Baydar H 2020. Tıbbi ve aromatik bitkiler bilimi ve teknolojisi. (8.baskı). Nobel Akademik Yayınları, Ankara, 21 sy.

Baytop T 1999. Türkiye'de bitkiler ile tedavi: geçmişte ve bugün. (1.baskı). Nobel Tıp Kitabevleri.

Bruno MJ, Onreshkova D, Simeonov S, Naidenova E, Pencheva I 2019. Analysis and identification of flavanoids and phenolcarbonic acid in extract plant of *Clinopodium vulgare*. American Journal of Analytical Chemistry. 10(12): 641.

Carvajal F, Huanca A, González-Teuber M, Urzúa A, Echeverría J 2017. Uses of hazardous medicinal plants: composition of the essential oil of *Clinopodium gilliesii* (Benth.) Kuntze (Lamiaceae), collected in Chile. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. 16(5): 486-492.

Ćavar S, Vidic D, Maksimović M 2013. Volatile constituents, phenolic compounds, and antioxidant activity of *Calamintha glandulosa* (Req.) Bentham. Journal of the Science of Food and Agriculture. 93(7): 1758-1764.

Dunkić V, Kremer D, Grubešić RJ, Rodríguez JV, Ballian D, Bogunić F, Stabentheiner E 2017. Micromorphological and phytochemical traits of four *Clinopodium* L. species (Lamiaceae). South African Journal of Botany. 111: 232-241.

El-Huneidi W, Shehab NG, Bajbouj K, Vinod A, El-Serafi A, Shafarin J, Abu-Gharbieh E 2020. *Micromeria fruticosa* induces cell cycle arrest and apoptosis in breast and colorectal cancer cells. Pharmaceuticals. 13(6): 115.

Gezici S, Sekeroglu N 2022. Comparative biological analyses on kenger and kenger coffee as novel functional food products. Journal of Food Science and Technology. 59(6): 2328-2338.

Gezici S 2019. Comparative anticancer activity analysis of saffron extracts and a principle component, crocetin for prevention and treatment of human malignancies. Journal of Food Science and Technology. 56(12): 5435-5443.

Gezici S, Sekeroglu N 2019a. Current perspectives in the application of medicinal plants against cancer: novel therapeutic agents. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry. 19(1): 101-111.

Gezici S, Sekeroglu N 2019b. Neuroprotective potential and phytochemical composition of acorn fruits. Industrial Crops and Products. 128: 13-17.

Gezici S, Sekeroglu N, Kijjoa A 2017. In vitro anticancer activity and antioxidant properties of essential oils from *Populus alba* L. and *Rosmarinus officinalis* L. from South Eastern Anatolia of Turkey. Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research. 51(3): 498-503.

Greenwell M, Rahman PKSM 2015. Medicinal plants: their use in anticancer treatment. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. 6(10): 4103.

Hanahan D, Weinberg RA 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 144(5): 646-674.

Harley RM, Paucar AG 2000. List of species of tropical American *Clinopodium* (Labiatae), with new combinations. Kew Bulletin. 917-927.

Hingst O, Blottner S 1995. Quantification of apoptosis (programmed cell death) in mammalian testis by DNA-fragmentation ELISA. Theriogenology. 44(3): 313-319.

Jaramillo BE, Stashenko E, Martínez JR 2010. Volatile chemical composition of the Colombian *Satureja brownei* (Sw.) Briq. and determination of its antioxidant activity. Revista Cubana de Plantas Medicinales. 15(1): 52-63.

Kampa M, Alexaki VI, Notas G, Nifli AP, Nistikaki A, Hatzoglou A, Castanas E 2004. Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action. Breast Cancer Research. 6(2): 1-12.

Kaya A 2019. Morphological characteristics of Clinopodium acinos and Clinopodium suaveolens (Lamiaceae) growing in Turkey. Journal of Research in Pharmacy. 23(1): 62-68.

Kılıc O, Kutlu MA, Özdemir FA 2017. Essential oil composition of *Clinopodium vulgare* L. subsp. *arundanum* (Boiss.) Nyman from Bingöl (Turkey). International Journal of Secondary Metabolite. 4(3, Special Issue 1): 11-15.

Kladniew BR, Polo M, Villegas SM, Galle M, Crespo R, Bravo MG 2014. Synergistic antiproliferative and anticholesterogenic effects of linalool, 1, 8-cineole, and simvastatin on human cell lines. Chemico-biological Interactions. 214: 57-68.

Koc K, Ozdemir O, Kizilkaya OF, Sengul M, Turkez H 2017. Cytotoxic activity of the aqueous extract of *Micromeria fruticosa* (L.) Druce subsp. *serpyllifolia* on human U-87 MG cell lines. Archives of Biological Sciences. 69(3): 449-453.

Lampronti I, Saab AM, Gambari R 2006. Antiproliferative activity of essential oils derived from plants belonging to the Magnoliophyta division. International Journal of Oncology. 29(4): 989-995.

Ludeña HMA. 2017. Método preparativo de ácido ursólico a partir de la planta de medicinal Flor de arena (*Clinopodium revolutum*) (Doctoral dissertation, Pontificia Universidad Catolica del Peru-Centrum Catolica Peru.

Mahady GB 2005. Medicinal plants for the prevention and treatment of bacterial infections. Current Pharmaceutical Design. 11(19): 2405-2427.

Matailo A, Bec N, Calva J, Ramírez J, Andrade JM, Larroque C, Armijos C 2019. Selective BuChE inhibitory activity, chemical composition, and enantiomer content of the volatile oil from the Ecuadorian plant *Clinopodium brownei*. Revista Brasileira de Farmacognosia. 29(6): 749-754.

Mohanty S, Kamolvit W, Zambrana S, Sandström C, Gonzales E, Östenson CG, Brauner A 2017. Extract of *Clinopodium bolivianum* protects against E. coli invasion of uroepithelial cells. Journal of Ethnopharmacology. 198: 214-220.

Mossman B, Light W, Wei E 1983. Asbestos: mechanisms of toxicity and carcinogenicity in the respiratory tract. Annual Review of Pharmacology and Toxicology. 23(1): 595-615.

Mutalib M A, Ali F, Othman F, Ramasamy R, Rahmat A 2016. Phenolics profile and anti-proliferative activity of Cyphomandra Betacea fruit in breast and liver cancer cells. SpringerPlus. 5(1): 1-13.

Pino J A, Estarrón M, Fuentes V 1997. Essential oil of *Satureja brownei* (Sw.) Briq. grown in Cuba. Journal of Essential Oil Research. 9(5): 595-596.

Ramakrishna W, Kumari A, Rahman N, Mandave P 2021. Anticancer activities of plant secondary metabolites: Rice callus suspension culture as a new paradigm. Rice Science. 28(1): 13-30.

Roy A, Jauhari N, Bharadvaja N 2018. 6 Medicinal Plants as. Anticancer Plants: Natural Products and Biotechnological Implements. 2: 109.

Russo A, Formisano C, Rigano D, Cardile V, Arnold NA, Senatore F 2016. Comparative phytochemical profile and antiproliferative activity on human melanoma cells of essential oils of three lebanese Salvia species. Industrial Crops and Products. 83: 492-499.

Salameh N, Shraim N, Jaradat N 2018. Chemical composition and enzymatic screening of *Micromeria fruticosa serpyllifolia* volatile oils collected from three different regions of West Bank, Palestine. BioMed Research International. 2018: 1-8.

Salameh N, Shraim N, Jaradat N, El Masri M, Adwan L, K'aibni S, AbuAlhasan M 2020. Screening of antioxidant and antimicrobial activity of *Micromeria fruticosa serpyllifolia* volatile oils: A comparative study of plants collected from different regions of west bank, Palestine. BioMed Research International. 2020: 1-7.

Saldaña-Bobadilla V, Ramirez JK, Perez-Chauca E, Minchan-Herrera P 2020. *Tiquilia paronychioides* (Phil.) at Richardson (Boraginaceae): Una revisión etnobotánica, etnofarmacológica toxicológica. Ethnobotany Research and Applications. 19: 1-13.

Searle J, Kerr JF, Bishop CJ 1982. Necrosis and Apoptosis Distinct Modes Death With Fundamentally Different Significance. Pathol Annu. 17: 229-259.

Senol FS, Sekeroglu N, Gezici S, Kilic E, Orhan, IE 2018. Neuroprotective potential of the fruit (acorn) from *Quercus coccifera* L. Turkish Journal of Agriculture and Forestry. 42(2): 82-87.

Shehab NG, Abu-Gharbieh E 2012. Constituents and biological activity of the essential oil and the aqueous extract of *Micromeria fruticosa* (L.) Druce subsp. *serpyllifolia*. Pakistan Journal of pharmaceutical Sciences. 25(3): 687-692.

Smith JH, Simons C 2004. Development of enzyme inhibitors as drugs. Enzymes and their inhibitors. Drug Development. 190-328.

Sobral MV, Xavier AL, Lima TC, Sousa DP 2014. Antitumor activity of monoterpenes found in essential oils. The Scientific World Journal. 95: 1-35.

Solís Quispe L, Pino JA, Tomaylla-Cruz C, Solís Quispe JA, Aragón-Alencastre LJ, Solís Quispe A 2018. Chemical composition and larvicidal activity of the essential oils from *Minthostachys spicata* (Benth.) Epling and *Clinopodium bolivianum* (Benth) Kuntze against Premnotrypes latithorax Pierce. American Journal of Essential Oils and Natural Products. 6(2): 22-28.

Strober W 2015. Trypan blue exclusion test of cell viability. Current Protocols in Immunology, 111(1): 1-2.

Sung H, Ferlay J., Siegel R L, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F 2021. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: Cancer Journal for Clinicians. 71(3): 209-249.

Telci I, Ceylan M 2007. Essential oil composition of *Micromeria fruticosa* Druce from Turkey. Chemistry of Natural Compounds. 43(5): 629-631.

Tewary P, Gunatilaka AL, Sayers TJ 2017. Using natural products to promote caspase-8-dependent cancer cell death. Cancer Immunology, Immunotherapy. 66(2): 223-231.

The Plant List 2021. (http://www.theplantlist.org/)

Tomas J, Gil L, Llorens-Molina JA, Cardona C, Garcia MT, Llorens L 2019. Biogenic volatiles of rupicolous plants act as direct defenses against molluscs: The case of the endangered *Clinopodium rouyanum*. Flora. 258: 151428.

Tošić S, Stojičić D, Stankov-Jovanovic V, Mitic V, Mihajilov-Krstev T, Zlatkovic B 2015. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of micropropagated and native Micromeria pulegium (Lamiaceae) extracts. Oxidation Communications. 38(1): 55-66.

Gokyigit N 2021. Türkiye Bitkileri Listesi / Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi 2021. (https://www.bizimbitkiler.org.tr/yeni)

Tuttolomondo T, Licata M, Leto C, Bonsangue G, Gargano ML, Venturella G, La Bella S 2014. Popular uses of wild plant species for medicinal purposes in the Nebrodi Regional Park (North-Eastern Sicily, Italy). Journal of Ethnopharmacology. 157: 21-37.

Vázquez AM, Aimar ML, Demmel GI, Cabalen ME, Decarlini MF, Cantero JJ, Ruiz GM 2014. Identification of volatile compounds of *Clinopodium odorum* (Lamiaceae): A comparison between HS-SPME and classic hydrodistillation. Boletín latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. 13(3): 285-296.

Yagi S, Babiker R, Tzanova T, Schohn H 2016. Chemical composition, antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities of essential oils from aromatic plants growing in Sudan. *Asian* Pacific Journal of Tropical Medicine. 9(8): 763-770.

Zhang L, Zhao F, Tao A 2020. Characterization of the complete chloroplast genome of *Clinopodium chinense* (Labiatae), a medicinal plant in southwest of China. Mitochondrial DNA Part B. 5(2): 1491-1493.

Zhang X, Yu Y, Cen Y, Yang D, Qi Z, Hou Z, Liu K 2018. Bivariate correlation analysis of the chemometric profiles of Chinese wild Salvia miltiorrhiza based on UPLC-Qqq-MS and antioxidant activities. Molecules. 23(3): 538-551.

Zheleva-Dimitrova D, Simeonova R, Gevrenova R, Savov Y, Balabanova V, Nasar-Eddin G, Danchev N 2019. In vivo toxicity assessment of *Clinopodium vulgare* L. water extract characterized by UHPLC-HRMS. Food and Chemical Toxicology. 134: 110841.